

UNCERTIFIED TRANSLATION

Cyclodextrin patent (translated)

(54) Protein Stabilizing Agent

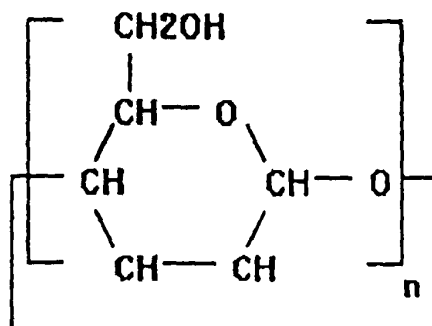
(11) 59-104556 (A) (43) 16.6.1984 (19) Japanese patent

(21) Appl. no. 57-215236 (22) 7.12.1982

(71) Sekisui kagaku kogyo K.K. (72) Kazutoshi Yamazaki (2)

TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION

1. General formula



(in formula, n is 6-8 integer)

Protein stabilizer of cyclized oligosaccharide is shown in the above formula.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Aldoses such as glucose have been used to prevent denaturation of protein in blood and enzyme. These aldoses usually have active hydroxide groups which denatures the protein by a nonenzymatic reaction with the amino acids of the protein at normal temperatures (5-30°C). For example, the amino acids of the β chain of hemoglobin (Hb) A might react with glucose. When blood is stored at 4 °C, Hb becomes saccharified and the level of HbA₁ a+b is raised. Since the reduced sugar reacts with the terminal amino group or lysine residue easily, human Hb changes to HbA₁c by the saccharified reaction between HbA and glucose in vitro or in vivo. An enzyme is also saccharified by a similar reaction, and its activity is decreased. The purpose of this invention is to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme.

The main purpose is to stabilize proteins by cyclized oligosaccharides which have the formula shown above.

Proteins in blood and enzymes are composed of amino acids and maintain a three dimensional formation through the secondary binding of amino acids. But protein is easily denatured by cutting its secondary binding. Measuring Hb and saccharified Hb in blood are regular medical test items, but Hb is denatured easily. For example, Hb denatures during storage, and when saccharified Hb is measured by high performance chromatography, denatured Hb is eluted at the same position as saccharified Hb. As a result, saccharified Hb will be over estimated. Therefore, to accurately measure saccharified Hb, it is necessary to stabilize Hb in the sample before storage. The aldose which has been used as a stabilizer, glycosylates the terminal amino group of Hb and makes saccharified Hb, so that the detection of this saccharified Hb is obviated as a positive error. Hence, aldoses are not appropriate as stabilizers for protein. Various studies have been done with respect to saccharides in order to prevent the denaturation of protein in blood and enzyme, and as a result, it is found that the cyclized oligosaccharide having the constitutional formula shown in the figure, that is cyclodextrin, consisting of 1.4 bond of dextrose, provides an excellent effect as a protein stabilizer for blood and enzyme. Three types of cyclodextrin (α -, β -, γ -) are prepared from starch by a reaction with amirase. α -cyclodextrin, β -cyclodextrin and γ -cyclodextrin can be used individually or together. The optimum concentration of cyclodextrin used as stabilizer for blood and enzyme is from 0.001 mole to 0.01 mole. The denaturation of the protein can be prevented for a long period of time, and in the case of, for example, blood, the detection of the hemoglobin saccharified by the denatured protein as a positive error is obviated in a clinical measurement of a saccharified hemoglobin value. The decrease in the activity of enzyme is obviated in the stage of a measurement relating to enzyme.

EXAMPLE 1

One ml of octylphenoxypolyethoxylethanol as a hemolysis reagent and 0.5 ml of β -cyclodextrin as the protein stabilizer were added to 1,000 ml of distilled water. Ten μ l of normal plasma treated with anticoagulant reagent was mixed with 1.5 ml of the above solution and stored at 24°C. Samples were taken out of the mixture after 0, 5, 10 and 15 hours, and the value of HbA_{1a+b} was measured by high performance liquid chromatography. The result is shown in figure 1. The result without β -cyclodextrin is also shown as open circles for comparison. The denaturation of protein was less with β -cyclodextrin than without β -cyclodextrin. After 15 hours, the value of HbA_{1a+b} in the sample with β -cyclodextrin was 60% of that without β -cyclodextrin.

EXAMPLE 2

Two grams of α -cyclodextrin were used instead of 0.5g of β -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA₁ a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.6%. The result was 87% of the value without α -cyclodextrin.

EXAMPLE 3

0.2g of γ -cyclodextrin was used instead of 0.5g of β -cyclodextrin under the same conditions as in example 1. The value of HbA₁ a+b measured by high performance liquid chromatography was 3.9%. The result was 86% of the value without γ -cyclodextrin.

EXAMPLE 4

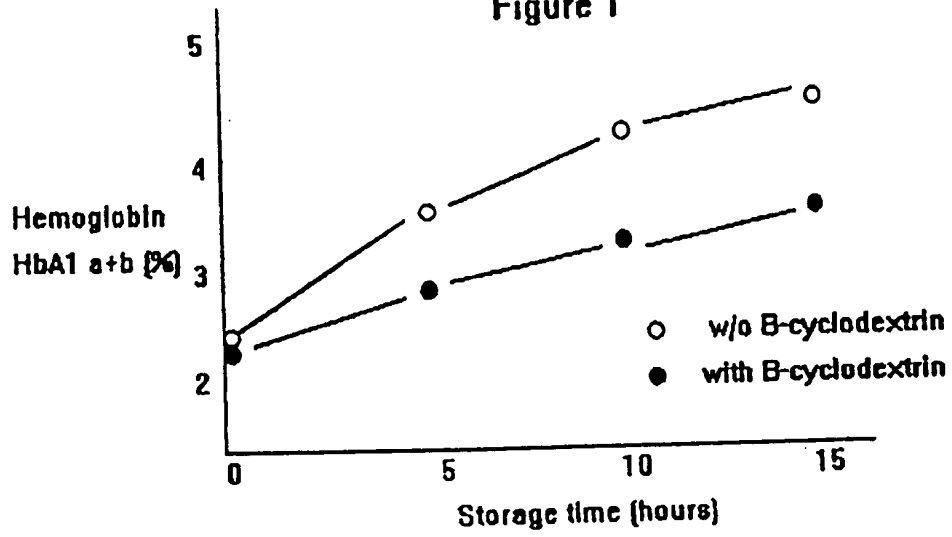
An ammonium sulfate suspension containing 5 mg/ml of β -galactosidase (β -Gal) was centrifuged at 2,000g for 15min.. The precipitate was collected and reconstituted with 1 ml of 0.01M-phosphate buffer (pH7.0) containing 1mM-magnesium chloride and 0.1M-sodium chloride. The solution, called β -Gal solution, was diluted 121 times with phosphate buffer and mixed with β -cyclodextrin solution in phosphate buffer at the ratio of 1 to 1 and incubated at 37°C for 20 hours. The activity in β -Gal was measured by the following method. 50 μ l of mixture was mixed with 500 μ l of 0.02M-phosphate buffer, pH7.2 containing 0.1%-ortho-nitrophenyl β -D-galactopyranoside, 1mM-sodium magnesium, 0.1M-sodium chloride, 0.1%-bovine serum albumin, and 0.1%-sodium azide at 30°C for 30 minute. The enzymatic reaction was stopped by adding 0.1M-sodium carbonate and the absorption of ortho-nitrophenyl derived from ortho-nitrophenyl β -D-galactopyranoside was measured at a 420 nm wavelength. The ratio of absorbance of the sample with and of the sample without stabilizer was used as the indicator for stability of the enzyme. The ratio at a concentration of 0.001M- β -cyclodextrin was 1.44 and 1.54 at 0.01M- β -cyclodextrin.

EXPLANATION OF FIGURE

The relationship between the value of HbA₁ a+b and storage time with and without β -cyclodextrin is shown in figure 1.

Patent Applicant
Sekisui Kagaku Kogyo K.K.
Representative: Mototoshi Fujinuma

Figure 1



公開特許公報 (A)

昭59-104556

Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

公開 昭和59年(1984)6月16日

G 01 N 33/66

8305-2G

A 61 K 35/14

7138-4C

発明の数 1

37/14

7138-4C

審査請求 未請求

37/54

7138-4C

C 12 N 9/96

7421-4B

G 01 N 33/68

8305-2G

(全 4 頁)

蛋白質安定化剤

大阪府三島郡島本町百山2番2号

特 願 昭57-215236

発 明 者 松尾文雄

出 願 昭57(1982)12月7日

奈良市法蓮町986番地

発 明 者 山崎和俊

出 願 人 積水化学工業株式会社

大津市南郷二丁目46番3号

大阪市北区西天満2丁目4番4号

発 明 者 石川文雄

号

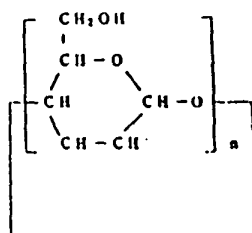
明 細 書

発明の名称

蛋白質安定化剤

特許請求の範囲

1. 一般式



(但し上式においてnは6乃至8の整数)

で表わされる環化オリゴ糖からなる蛋白質安定化剤

発明の詳細な説明

本発明は血液、酵素等の蛋白質安定化剤に関する。

従来から血液、酵素等の蛋白質の変性を防ぐ

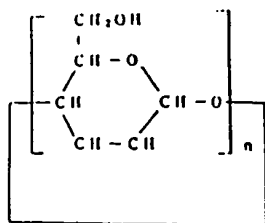
ためにグルコース等のアルドース類が添加されてきた。

しかしながらグルコース等のアルドース類は通常活性水酸基を有しており、その活性水酸基と蛋白質中のアミノ酸が炭酸(5~30度)で非酵素的に反応し蛋白質の変性を生ずる。例えばヘモグロビン(Hb)Aのβ鎖のアミノ末端とグルコースが糖化反応したり、血液が4年で保存された場合においてもHbが糖化しHbA_{1c}の増加をきたす。

このように環元糖では蛋白質中のアミノ末端及びリジン残基と容易に反応するので、例えば人HbではHbAとグルコースが体内、体外を問わず反応して糖化しHbA_{1c}を生ずる。酵素でも同様に糖化を生じ酵素活性の低下をきたすことになる。

本発明はこのような欠点を解消し、血液、酵素等における蛋白質の変性を防ぐことを目的とするものであり、その要旨とするところは、

一般式



(但し上式において n は 6 乃至 8 の数値)
 で表わされる環化オリゴ糖からなる蛋白質安定
 化剤に付する。

次に本発明蛋白質安定化剤について更に詳細に
 説明する。

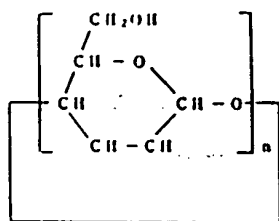
血液、酵素等の蛋白質はアミノ酸を構成成分と
 し、その二次結合によって立体的形状が保たれ
 ている。しかしその二次結合は切断を受け、蛋
 白質の特性を失なうことになりやすい。

ところで血液中の Hb は血中 Hb 濃度測定及び
 血中酸化 Hb 濃度測定等の臨床検査の対象とな
 るが、この Hb も変性を生ずる。例えば酸化 Hb
 の測定では測定機体の保存中に Hb の変性を生

じ、変性 Hb は高速液体クロマトグラフィーに
 よる分離測定では酸化 Hb の位置に検出される
 ため、見掛け上変性 Hb が増加すると酸化 Hb 濃
 度に対し正の誤差を生ずる。このため元々機体
 に含まれていた正確な酸化 Hb 濃度を測定する
 には機体の保存及び使用中に Hb の変性を防ぐ
 ことが必要となる。しかしこれ迄使用されてき
 たアルドース類では Hb のアミノ末端とグリコ
 シル化し酸化ヘモグロビンとなるので、元々機
 体中に含まれていた酸化 Hb 濃度に対して正の
 誤差を生ずる。このためアルドース類は蛋白質
 安定化剤としての適用性を欠いている。

そこで血液、酵素の蛋白質の変性を防ぐために
 本発明者等が特許について種々検討を行った結
 果次の構造式を有する環化オリゴ糖が血液、酵
 素の蛋白質安定化剤として与えた効果が認めら
 れることを見出した。

すなわち



上式において n の値は 6, 7 又は 8 である。

上記の環化オリゴ糖はデキストロースの 1,4 結
 合からなるシクロデキストリンである。

上記の環化オリゴ糖を得るには、デンプン類に
 アミラーゼを作用させて分解させ、その分解物
 に四塩化エチレン-四塩化エタン混合溶媒を加
 えてシクロデキストリン混合物を沈殿させる。
 次にその沈殿物を水に溶解させて α -ブタノ
 ンを加えると、 β -シクロデキストリン ($n=7$)、
 γ -シクロデキストリン ($n=8$) のみが沈
 降し、溶液内には α -シクロデキストリン ($n=6$)
 と一部の β -シクロデキストリン及び γ -
 シクロデキストリンが残る。さらに α -シクロ
 デキストリンをシクロヘキサンにより、 β -シ

クロデキストリンをフルオロベンゼンにより、
 又 γ -シクロデキストリンをアントラセンによ
 り夫々分別沈殿することにより 3 種のシクロデ
 キストリンをデンプン分解物から単離すること
 ができる。

α -シクロデキストリン、 β -シクロデキスト
 リン、 γ -シクロデキストリンは夫々単独で使用
 されてもよいし、これらが併用されてもよい。
 これらは血液、酵素に対する安定化剤として使
 用されるが、その場合の使用量は 0.001 モル
 乃至 0.01 モルの範囲に付するものとされるの
 が好適である。

本発明によれば上記構造式の環化オリゴ糖が血
 液、酵素等に加えられることにより、蛋白質の
 変性を長期間防ぐことができ、例えば血液の場
 合には酸化 Hb 値の臨床測定において蛋白質の
 変性による酸化 Hb が正の誤差として検出され
 ることがないものとなり、又酵素においても活
 性の低下をきたすことがないものとなる。

実施例 1

凍庫水 100 ml 中に、溶血剤としてオクタノール、
 エノキシポリエトキシエタノール 1 ml、及び蛋
 白質安定化剤として β -シクロデキストリン Q5
 g を溶解した溶液 1.5 ml に健康人は凝固化血液
 10 μ l を混合し、かるく振盪後 24 $^{\circ}$ C で保存し、
 0, 5, 10, 15 時間後の HbA_{1a+b} 値を高
 速液体クロマトグラフィー装置にかけて分離測
 定した。その結果を第 1 図の実験グラフで示す。
 尚これとの比較のために β -シクロデキストリン
 のみを除いた溶液を用いて同一条件で HbA_{1a+b}
 値を測定した結果を第 1 図の点線グラフで示す。
 これらの結果から明らかなように、 β -シクロ
 デキストリンを使用した場合は、使用しない場
 合に比較して蛋白質の経時変化が少なく、15
 時間後の値では β -シクロデキストリン使用の
 場合は、使用しない場合に比較して 6 割程度に
 低減された。

実施例 2

実施例 1 において β -シクロデキストリンにか
 えて α -シクロデキストリン 2 g を使用した以

外は実施例 1 と同様にして血液中の HbA_{1a+b}
 値を高速液体クロマトグラフィーにより分離測
 定した結果 3.6 % であり、 α -シクロデキスト
 リンを使用しない場合の 8.7 % であった。

実施例 3

実施例 1 において β -デキストリンにかえて γ -
 デキストリン Q.2 g を使用した以外は実施例
 1 と同様にして血液中の HbA_{1a+b} 値を高速液
 体クロマトグラフィーにより分離測定した結果
 3.9 % であり、 γ -デキストリンを使用しない
 場合の 8.6 % であった。

実施例 4

5 μ g/ml の β -ガラクトシダーゼ（以下 β -Gal
 と略す）の緩安懸濁液を 2000 g で 15 分間
 遠心分離しその上清を 1 μ M 塩化マグネシウム、
 0.1 M 塩化ナトリウムを含む 0.01 M リン酸緩
 衝液（pH 値 7.0）1 ml に溶解させて β -Gal 溶
 液を調製した。さらにその β -Gal 溶液をリン
 酸緩衝液により 1:21 希釈したもの、 β -
 シクロデキストリンのリン酸緩衝液溶液を各試

比で 1:1 に混合後、1 μ g/μl の割合にとり、
 37 $^{\circ}$ C で 20 時間インキュベートした。その後、
 β -Gal の酵素活性を測定し、試料の比値を比
 較した。酵素活性の測定は、50 μ l の酵素溶
 液を 500 μ l の 0.1 重量部のオルソーニトロフ
 エニル β -リーガラクトピラノシド、1 μ M 塩化
 マグネシウム、0.1 M 塩化ナトリウム、0.1 重
 量部の牛血清アルブミン、0.1 重量部のソジ化
 ナトリウムを含む 0.02 M リン酸緩衝液（pH
 値 7.2）と混合し、30 $^{\circ}$ C で 30 分反応後、2
 ml の 0.1 M 炭酸ナトリウムを加えて酵素反応を
 停止させ、オルソーニトロフエニル β -リーガ
 ラクトピラノシドの分解によって生じたオルソ
 ニトロフエノールの吸光度を 420 nm の波長
 の可視分光光度計にてその吸光度によって求め
 た。この場合添加剤の入っていないブランクと
 の吸光度比を求め酵素安定化効果とした。

この場合 β -シクロデキストリンの濃度は 0.001
 mol/l で安定化率（試料の吸光度/ブランクの
 吸光度）は 1.44 であり濃度 0.01 mol/l では安

定化率は 1.54 であった。

図面の簡単な説明

第 1 図は実施例 1 において β -シクロデキスト
 リンを使用した場合及び使用しない場合の
 HbA_{1a+b} 値と検体保存時間との関係を示すグ
 ラフである。

特許出願人

積水化学工業株式会社
 代表者 藤 沼 基 利

2.1.2

